

Aus dem Institut für Rechtsmedizin der
Universität Erlangen-Nürnberg
em. Direktor: Professor Dr. Dr. E. Weinig

**Vergleichende Untersuchung zur Hydrolyse
von E 600, Chlorthion und P=O Chlorthion
durch menschliche Serumenzyme**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
HUBERTUS METZNER
aus Bamberg

Aus dem Institut für Rechtsmedizin der
Universität Erlangen-Nürnberg
em. Direktor: Professor Dr. Dr. E. Weinig

**Vergleichende Untersuchung zur Hydrolyse
von E 600, Chlorthion und P=O Chlorthion
durch menschliche Serumenzyme**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
HUBERTUS METZNER
aus Bamberg



Dekan: Prof. Dr. Dr. H. Pauly
Referent: Prof. Dr. Dr. M. Geldmacher-v. Mallinckrodt
Korreferent: Prof. Dr. Dr. E. Weinig
Tag der mündlichen Prüfung: 31.7.1973

Meinen lieben Eltern
in Dankbarkeit
gewidmet



Digitized by the Internet Archive
in 2026

A. Einleitung

Literatur-Übersicht über die Problemstellung
der enzymatischen Hydrolyse von Alkyl-Aryl-
Phosphorsäureester im menschlichen Serum

B. Eigene Untersuchungen

1. Methodik und Material

2. Ergebnisse und statistische Auswertung

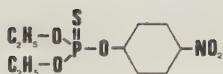
C. Diskussion und Zusammenfassung

D. Literaturverzeichnis

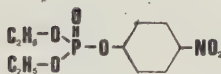
Lebenslauf

Einleitung

Schon seit vielen Jahren haben E 605 (= Parathion = O,O-Diäthyl-O-p-nitrophenylthiophosphat) und Chlorthion (= 3-Chlor-4-nitro-phenyldimethylthiophosphat) einen festen Platz unter den Insektiziden. SCHRADER (1954) setzte bei seiner systematischen Variation des Parathionmoleküls Chlor als Substituenten an den Phenolring und erhielt eine Verbindung mit niederer Toxizität für Warmblütler, nämlich Chlorthion.



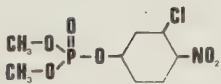
E 605



E 600



Chlorthion



P=O Chlorthion

Innerhalb des menschlichen Körpers werden beide Verbindungen zu ihren $P=O$ - Analogen ($P=O$ Chlorthion und Paraoxon = E 600) oxydiert, was gleichzeitig einer Aktivierung ihrer Hemmwirkung gegen Cholinesterase (zum größten Teil gegen Acetyl-cholinesterase) gleichkommt. Im Stoffwechsel folgt hierauf eine enzymatische Hydrolyse jener $P=O$ Verbindungen an der Säure-Anhydrid-Bindung (KOELLE 1963; MAZUR 1946 b; NEAL 1967).

AUGUSTINSSON (1955 a) nahm unter Verwendung der Forschungsergebnisse von JANSEN, ALDRIDGE (1955 a), WILSON, WAGNER-JAUREGG (1954), MEYERS u.a. (Literatur siehe bei AUGUSTINSSON 1955 a) folgenden Reaktionsmechanismus zur Inaktivierung der organischen $P=O$ Verbindungen an:

Die Reaktionen (2) und (3) stellen die eigentlichen Hemmungsreaktionen der organischen Phosphorverbindungen dar. Die Reaktionen (5) und (6) zeigen die Dephosphorylierung des gehemmten Enzyms durch die AUGUSTINSSON'sche "Phosphorylphosphatase" (AUGUSTINSSON 1954 a), bzw. durch eine bis heute noch nicht eindeutig bestimmte und isolierte Enzymgruppe. Gleichzeitig hält die angenommene Enzymgruppe die Reaktionen (2) und (3) zurück und verhindert damit die im großen und ganzen irreversible Hemmung der Acetylcholinesterase (MAZUR und Mitarb. 1946 a).

Über die Frage, welches Enzym bzw. welche Enzyme verantwortlich sind für die Hydrolyse von organischen Phosphorverbindungen, sind von verschiedenen Seiten umfangreiche Untersuchungen vorgenommen worden. Vornehmlich wurden hierbei Serumfraktionen als Enzymquellen verwendet. Da jedoch die gleichen Serumenzyme u.U. fähig sind, Ester zu spalten, die keinen Phosphor enthalten, ließ sich weniger über ihre Spezifität und Eigenschaften sagen als etwa bei den Gewebeenzymen (KOELLE 1963).

MAZUR und BODANSKI fanden 1946, daß sich im Plasma und in den Geweben vom Kaninchen und Menschen ein DFP-hydrolysierendes Enzym befindet, welches sich nicht mit einer bekannten Cholinesterase oder Phosphatase identisch zeigte. Bei ihren Untersuchungen wurde DFP nur

zu einem extrem niedrigen Anteil an der Alkyl-Ester-Bindung, jedoch im entscheidendem Maße an der Phosphor-Fluor-Bindung gespalten. MAZUR und BODANSKI (1946 b) konnten das verantwortliche Enzym 30-fach konzentrieren (unter Verlust der Phosphatase-, Esterase- und Cholinesterase-Aktivität) und gaben ihm den Namen "Phosphofluorase" bzw. "Fluorophosphatase" (GROB und Mitarb. 1947).

ALDRIDGE (1953 a) teilte die Serumesterasen von Kaninchen, Pferd und Ratte nach ihrer Hemmbarkeit durch E 600 in eine A-Esterase und B-Esterase ein. Jene Esterase, welche durch E 600 nicht inaktiviert wurde, nannte er A-Esterase (Aryl- oder Aromatic-Esterase). In einer weiteren Arbeit fand ALDRIDGE (1953 b) ein E 600 - hydrolysierendes Enzym, genannt E 600 - Esterase, wobei er durch vergleichende Experimente bezüglich der Eigenschaften dieses Enzyms feststellte, daß sie identisch ist mit der schon bekannten A-Esterase, aber nicht mit der sauren und alkalischen Serumphosphatase. Innerhalb der einzelnen Tiergattungen schwankten die jeweiligen Enzymaktivitäten, was seiner Meinung nach auf die Proteinunterschiede zurückzuführen ist.

Unter den fünf bestehenden Phenol-Ester-hydrolysierenden Esterasen (erythrocyte-acetocholinesterase, plasma-butyrylcholinesterase, erythrocyte-aliesterase,

erythrocyte-aromatic-esterase, plasma-aromatic-esterase) des menschlichen Blutes scheinen nach MOUNTER und WHITTAKER (1953) die erythrocyte-aromatic-esterase und die plasma-aromatic-esterase, wenn nicht identisch, so doch extrem ähnlich zu sein. Nach jenen Autoren sind zudem beide wahrscheinlich identisch mit der von ALDRIDGE (1953 a; 1953 b) gefundenen A-Esterase.

Die ausgedehnten Untersuchungen über die enzymatische Hydrolyse von organischen Phosphorverbindungen von AUGUSTINSSON und HEIMBÜRGER (1954 a; 1954 b; 1954 c; 1954 e; 1955 a; 1955 b; 1957) beschäftigten sich an erster Stelle mit Tabun, welches durch ein Enzym hydrolysiert wird, einstweilen als "tabunase" bezeichnet. Es ist jedoch nicht spezifisch für Tabun, und so führten die Autoren eine allgemeine Bezeichnung für organische Phosphorverbindungen-hydrolysierende Enzyme ein, nämlich "Phosphorylphosphatase". Letztere und die Cholinesterase konnten sie in Cohn'schen Fraktionen aus dem menschlichen Serum von anderen Esterasen trennen (Fraktion IV-1: Tabunase; Fraktion IV-6: Cholinesterase) (AUGUSTINSSON und HEIMBÜRGER 1954 b). Es wurde ferner vermutet, daß Tabun und DFP (Diisopropylfluorophosphat) vom selben Enzym hydrolysiert werden.

Tabun wird bei der hydrolytischen Spaltung an der P-CN-Bindung getrennt. Die dabei entstehenden Reaktions-

produkte üben einen schwach-hemmenden Einfluß auf die Tabunaseaktivität aus (etwa 15 % des ursprünglichen Tabun wird in der enzymatischen Hydrolyse nicht angegriffen) (AUGUSTINSSON 1954 c).

In einer weiteren Arbeit untersuchten AUGUSTINSSON und HEIMBÜRGER (1954 a) die Spezifität jener Phosphorylphosphatase (=Tabunase). Ihre Ergebnisse zeigten, daß von ihr (isoliert innerhalb der Fraktion IV-1) sowohl Tabun, DFP wie Mintacol = E 600 hydrolysiert wird, E 600 jedoch noch durch "andere" Enzyme gespalten werden kann. Unter anderem stellten sie hierbei fest, daß Chlorthion nicht angegriffen wird. In vergleichenden Experimenten zwischen Tabun und Mintacol zeigte AUGUSTINSSON und Mitarb. (1954 e), daß (speziell im Kaninchenblut) zwei Enzyme vorhanden sind, wobei jedes Enzym jedes Substrat spaltet, und daß das Enzym, welches Mintacol spaltet, von ALDRIDGE A-Esterase genannt, nicht identisch ist mit der Tabunase. AUGUSTINSSON vermutet deshalb, daß E 600 sowohl durch jene ALDRIDGE'sche A-Esterase als auch durch eine Phosphorylphosphatase hydrolysiert wird, beide wahrscheinlich anwesend in der Cohn'schen Fraktion IV-1.

1960 versuchte dann MAIN das Paraoxon-hydrolysierende Enzym aus dem Schais-Serum möglichst rein darzustellen.

Durch eine 330 - 385 -fache Reinigung resultierte ein elektrophoretisch ermitteltes 80 - 95 %ig reines Enzympräparat. MAIN stellte bei der gereinigten Fraktion eine Zunahme der Michaelis-Konstante (0,29 mM auf 4,2 mM) fest, was er auf "Paraoxonase"-Aktivatoren im Nativserum zurückführte, welche durch den Reinigungsvorgang entfernt worden zu sein scheinen. Außerdem ermittelte er das Molekulargewicht der Paraoxonase mit 35000 - 50000.

Bei in vitro Versuchen mit den Seren weißer Mäuse untersuchten SCHAUMANN und SCHILLER (1960) die Inaktivierung von Cholinesterase-Hemmern. Hierbei gingen sie davon aus, daß an der Inaktivierung zwei voneinander unabhängige Vorgänge beteiligt sind: Eine Adsorption an das Serum und eine fermentative Zerstörung. Paraoxon wird durch das Serum schnell abgebaut und außerdem stark adsorbiert. DFP jedoch wird weder abgebaut, noch adsorbiert.

1961 gelang es dann ERDÖS und BOGGS, die Vermutung früherer Arbeiten zu bekräftigen, daß mehrere Faktoren für die Hydrolyse von Paraoxon im menschlichen Serum verantwortlich sind. Sie zeigten, daß die Paraoxonhydrolysierende Aktivität in der Fraktion IV-1 zwar durch Äthylendiamintetraacetat vollständig gehemmt werden kann, daß aber hierbei nicht die Gesamtaktivität

des Nativserum erfaßt war. Auf der Suche nach einer Äthylendiamintetraacetat-resistenten Aktivität fanden sie eine E 600-spezifische Enzymaktivität im Humanalbumin (Fraktion V), welche durch Aluminon (Aurintricarbonsäure) völlig auszuschalten war. Bei Mischung der Fraktion IV-1 und V waren die Ergebnisse mit den selektiven Inhibitoren ähnlich dem normalen Serum.

In der gleichen Richtung liefen die Untersuchungen von SKRINJARIC-SPOLJAR und Mitarb. (1968). Sie versetzten menschliches Serum mit Paraoxon und Armin, und es zeigte sich, daß für beide Substrate sowohl in der Fraktion IV-1 als auch in der Fraktion V eine Aktivität bestand. In der erstgenannten war die Aktivität für beide Substanzen höher als in der zweiten. In der Fraktion IV-1 erwies sich die Paraoxon-hydrolysierende Aktivität größer als die Armin-hydrolysierende Aktivität. In der Fraktion V war genau das Gegenteil zu beobachten.

Ihre Ergebnisse bekräftigen die Hypothese, daß mehr als ein Enzym für die Hydrolyse von Paraoxon (und für Armin) im menschlichen Serum existiert. Nativseren aber enthalten nach Meinung von SKRINJARIC-SPOLJAR und Mitarb. wahrscheinlich noch ein Enzym mit ausgesprochener "Paraoxonase"-Aktivität, da in der Mehrzahl der Seren Paraoxon schneller hydrolysiert wurde als Armin, wo-

hingegen eine Mischung von Fraktion IV-1 und Fraktion V eine größere "Arminase"- als "Paraoxonase"-Aktivität hervorbrachte.

KRISCH (1968) unterscheidet hinsichtlich der E 600 - spaltenden Aktivität des Serums beim Menschen zwei sich überlagernde Gruppen von Normalpersonen. Es ergibt sich daraus die Frage, ob diese Aktivitätsunterschiede auf quantitative Unterschiede des gleichen Enzymproteins oder auf zwei qualitativ verschiedene Enzymproteine zurückzuführen sind. KRISCH findet bei den Versuchspersonen mit hohen und niedrigen Aktivitäten gleiche Michaeliskonstanten, wobei es im Einzelfall nicht möglich war, einzelne Personen wegen des großen Überlagerungsbereiches bestimmten Aktivitätsgruppen zuzuordnen. Auch hält er es für möglich, daß die Aktivitätsunterschiede zwischen den beiden Gruppen genetisch bedingt sind.

Die Untersuchungen von GELDMACHER-V. MALLINCKRODT und LINDORF (1969) und GELDMACHER-V. MALLINCKRODT, RABAST und LINDORF (1969) beschäftigten sich mit dem Vergiftungsgrad der Serumcholinesterase durch E 600 in bestimmten Konzentrationen. Es ergab sich, daß die Seren entsprechend dem Vergiftungsgrad in drei gut unterscheidbare Gruppen mit niedriger, mittlerer und hoher Restaktivität einteilen waren.

BAUMGARTNER (1970) versuchte deshalb fortführend diese Erscheinungen so zu deuten, daß entweder ein Polymorphismus der Serumcholinesterasen oder ein Polymorphismus des E 600 - spaltenden Fermentes besteht, wobei letzteres der Literatur nach am wahrscheinlichsten erscheint. Aus ihren Untersuchungsergebnissen kommt zum Ausdruck, daß eine gewisse Abhängigkeit zwischen den Cholinesterasen-Restaktivitäten und dem Ausmaß der fermentativen Spaltung von Paraoxon besteht. Sie errechnete einen Korrelationskoeffizienten von 0,68. Dies zeigte zwar eine starke Abhängigkeit der ChE-Restaktivität nach Vergiftung mit E 600 von der Paraoxon-spaltenden Enzymaktivität, ließ aber gleichzeitig erkennen, daß noch andere Faktoren für die Größe der ChE-Restaktivität vorhanden sein müssen.

Im Hinblick auf diesen Polymorphismus innerhalb der enzymatischen Hydrolyse von Paraoxon sollte von BURGIS und in der vorliegenden Arbeit die Spezifität dieses Enzymsystems weiter erhellt werden.

BURGIS untersuchte hierbei das enzymatische Hydrolysevermögen menschlicher Blutseren gegenüber den Verbindungen:

Parathion, Methylparathion, Paraoxon und Methylparaoxon. Während die Thioverbindungen, Parathion und Methylparathion, neben der durch das alkalische Milieu der ver-

wendeten Pufferlösung bedingten geringen Spontanhydrolyse keiner enzymatischen Hydrolyse-Aktivität ausgesetzt waren, zeigten die P=O Analogen, Paraoxon und Methylparaoxon, daß sie durch ein Enzymsystem ("Paraoxonase") im menschlichen Serum hydrolysiert werden. Zudem stellte BURGIS fest, daß Paraoxon und Methylparaoxon wahrscheinlich von dem gleichen Enzymsystem hydrolysiert wird (Korrelationskoeffizient = 0,965), und daß eine Substitution der Äthyl-Gruppen durch Methylgruppen keinen Einfluß auf das enzymatische Hydrolyse-Verhalten jener "Paraoxonase" nimmt.

Was die Verteilung der Enzymaktivitäten innerhalb seiner untersuchten Personengruppe betrifft, so ergab sich eine normallogarithmische Verteilung mit vermutlich zwei Maxima von Häufigkeiten, ähnlich den Ergebnissen von KRISCH (1968).

Eigene Untersuchungen

Methodik und Material

Zur Bestimmung der Aktivitäten der hypothetisch angenommenen Enzymgruppen vom menschlichen Serum, welche Paraoxon (E 600) bzw. P=O Chlorthion bzw. Chlorthion hydrolytisch spalten, wurde der kontinuierliche photometrische Test nach K. KRISCH (1968) angewandt. Hierbei wurde in einem selbstregistrierenden Spektralphotometer Modell DK 2 der Firma Beckman Instruments, bei der Wellenlänge 405 nm die Extinktion der durch Hydrolyse freigesetzten Menge an p-Nitrophenol bzw. 3-Chlor-p-nitrophenol gemessen.

In Abständen von jeweils 30 sec. und über einen Zeitraum von 150 sec. wurde die Extinktion registriert. Zur Auswertung jedoch kam nur die Extinktionsdifferenz von 150 minus 30 sec. abzüglich der Extinktionsdifferenz des Leerwertes (E 600 bzw. (P=O)Chlorthion-Hydrolyse im alkalischen Milieu ohne Serum), über 2 Minuten. Alle Messungen fanden bei einer konstanten Temperatur von 25,3 ° C statt.

Die Lösungen entsprachen im allgemeinen der Vorschrift des Standard-Tests von KRISCH (1968). Nur zu der enzymatischen Spaltung von P=O Chlorthion mußte der pH-Wert des Glycin-Natronlauge-Puffers von pH 11,2 auf pH 10,3 gesenkt werden, da wir durch vorausgehende Experimente fanden, daß bei pH 10,3 die im alkalischen Milieu stattfindende spontane Hydrolyse von P=O Chlorthion, also die von Enzymen unabhängige hydrolytische Spaltung, im Vergleich zur enzymatischen Gesamthydrolyse (Enzyme + alkalisches Puffermilieu) günstiger lag als bei pH 11,2. Dies ermöglichte es dann auch, die eigentliche enzymabhängige Hydrolyse genauer zu bestimmen, da die störende Spontanhydrolyse von P=O Chlorthion relativ gering gehalten werden konnte.

Um einen zuverlässigen Vergleich zwischen der hydrolytischen Aktivität gegen E 600 und Chlorthion zu erhalten, wurde die Aktivität gegen E 600 bei pH 11,2 und pH 10,3 und die gegen P=O Chlorthion bzw. Chlorthion ebenso bei pH 10,3 gemessen. Die große Wirkungsbreite des 0,1 M Glycin-NaOH-Puffer, der in beiden Fällen (pH 11,2 und pH 10,3) als Puffersystem verwendet wurde, ermöglichte die Ausschaltung eines pufferbedingten Störfaktors zwischen den einzelnen Versuchsreihen.

Es erwies sich im Meßverfahren als sehr vorteilhaft, das Puffergemisch von der umgebenden Luft (insbesondere der Atemluft beim Pipettieren) möglichst fernzuhalten, um ein Absinken des pH-Wertes im Verlauf der Messung zu vermeiden.

Zur Umrechnung der Extinktionsdifferenzen in Mol abgespaltenes p-Nitrophenol bzw. 3-Chlor-p-nitrophenol wird der molare Extinktionskoeffizient

1. von p-Nitrophenol (in Gly-NaOH-Puffer pH 11,2)

$$\epsilon_{405 \text{ nm}} = 18,05 \cdot 10^6 \text{ cm}^2 \text{ Mol}^{-1}$$

2. von p-Nitrophenol (in Gly-NaOH-Puffer pH 10,3)

$$\epsilon_{405 \text{ nm}} = 17,85 \cdot 10^6 \text{ cm}^2 \text{ Mol}^{-1}$$

3. von 3-Chlor-p-nitrophenol (in Gly-NaOH-Puffer
pH 10,3)

$$\epsilon_{405 \text{ nm}} = 13,45 \cdot 10^6 \text{ cm}^2 \text{ Mol}^{-1}$$

zugrundegelegt. Entsprechend den veränderten Versuchsbedingungen muß daher auch in die von KRISCH (1968) angegebene Formel zur Errechnung der Enzymaktivität für die einzelnen Versuchsreihen der jeweilige Extinktionskoeffizient eingesetzt werden:

$$1. \text{ Aktivität}_{E600 \text{ pH } 11,2} = \frac{E \cdot 10 \cdot 2,4 \cdot 20}{0,1805 \cdot 2} = E \cdot 1329 \text{ } \mu\text{Mol/Min} \cdot l$$

$$2. \text{ Aktivität}_{E600 \text{ pH } 10,3} = \frac{E \cdot 10 \cdot 2,4 \cdot 20}{0,1785 \cdot 2} = E \cdot 1345 \text{ } \mu\text{Mol/Min} \cdot l$$

$$\begin{aligned} 3. \text{ Aktivität}_{P=0 \text{ Chlorthion pH } 10,3} &= \\ &= \frac{E \cdot 10 \cdot 2,4 \cdot 20}{0,1345 \cdot 2} = E \cdot 1784 \text{ } \mu\text{Mol/Min} \cdot l \end{aligned}$$

Als Enzymquelle verwendeten wir das nicht mehr als 24 Stunden alte Serum von 33 gesunden Personen im Alter von 20 bis 53 Jahren; davon waren 9 weiblichen und 22 männlichen Geschlechts.

Ergebnisse und statistische Auswertung

Analog zu den Versuchen bei BURGIS zeigte sich auch bei meinen Untersuchungen, daß die Thio-Verbindung, nämlich Chlorthion (= 3-Chlor-4-nitrophenyldimethylthiophosphat), im alkalischen Milieu kaum einer fermentativen Spaltung durch menschliche Serumenzyme unterworfen ist. Die Abspaltung von 3-Chlor-p-nitrophenol aus Chlorthion unter Zugabe von Serum lag in der Größenordnung der spontanen Hydrolyse von Chlorthion im alkalischen Milieu.

Wie bereits oben erwähnt, war es günstiger, das hydrolytische Verhalten menschlichen Serums gegenüber P=O Chlorthion nicht im alkalischen Bereich von pH 11,2, wie es KRISCH (1968) für E 600 angab, zu untersuchen, sondern es erwies sich der pH von 10,3 als vorteilhafter, da hierbei die spontane Hydrolyse von P=O Chlorthion größenmäßig in einem besseren Verhältnis zur enzymatischen Hydrolyse stand.

Um die Ergebnisse der Hydrolyse von E 600 und P=O Chlorthion unter Ausschluß von unterschiedlichen Versuchsbedingungen vergleichen zu können, mußte die enzymatische Hydrolyse von E 600 sowohl bei pH 10,3 als auch bei pH 11,2 gemessen werden. Die hierbei gefundenen

Name	Enzymaktivität bei pH 10,3 ($\mu\text{Mol/Min}\cdot\text{l}$)	Enzymaktivität bei pH 11,2 ($\mu\text{Mol/Min}\cdot\text{l}$)
1. Weinich H.	55	53
2. Schweinitz H.	63	68
3. Killermann J.	65	72
4. Drenckhahn W.	70	73
5. Jäckel E.	65	77
6. Metzner Ha.	70	80
7. Helbig Ch.	70	80
8. Beck A.	83	89
9. Metzner Hu.	89	90
10. Bräunlein N.	79	92
11. Bauernschmitt H.	91	93
12. Gaitsch W.	90	93
13. Metzner A.	83	96
14. Büchler K.	90	105
15. Landendörfer P.	94	106
16. Braun G.	151	162
17. Lautenbach	171	201
18. Brütting J.	238	241
19. Kunsch H.	230	246
20. Geldmacher J.	235	249
21. Graf D.	239	262
22. Binkowsky R.	273	278
23. Thiel H.-J.	293	279
24. Blieter R.	278	280
25. Haggemüller R.	289	286
26. Ruß R.	292	299
27. Drexler J.	309	315
28. Faulbaum	312	316
29. Grunich A.	325	327
30. Meier U.	316	339
31. Walz K. H.	374	401
32. Geldmacher H.	410	444
33. Obiri F.	453	451

Tabelle 1: E 600 - hydrolysierende Enzymaktivitäten im menschlichen Serum bei pH 10,3 und pH 11,2 (Glycin-NaOH-Puffer)

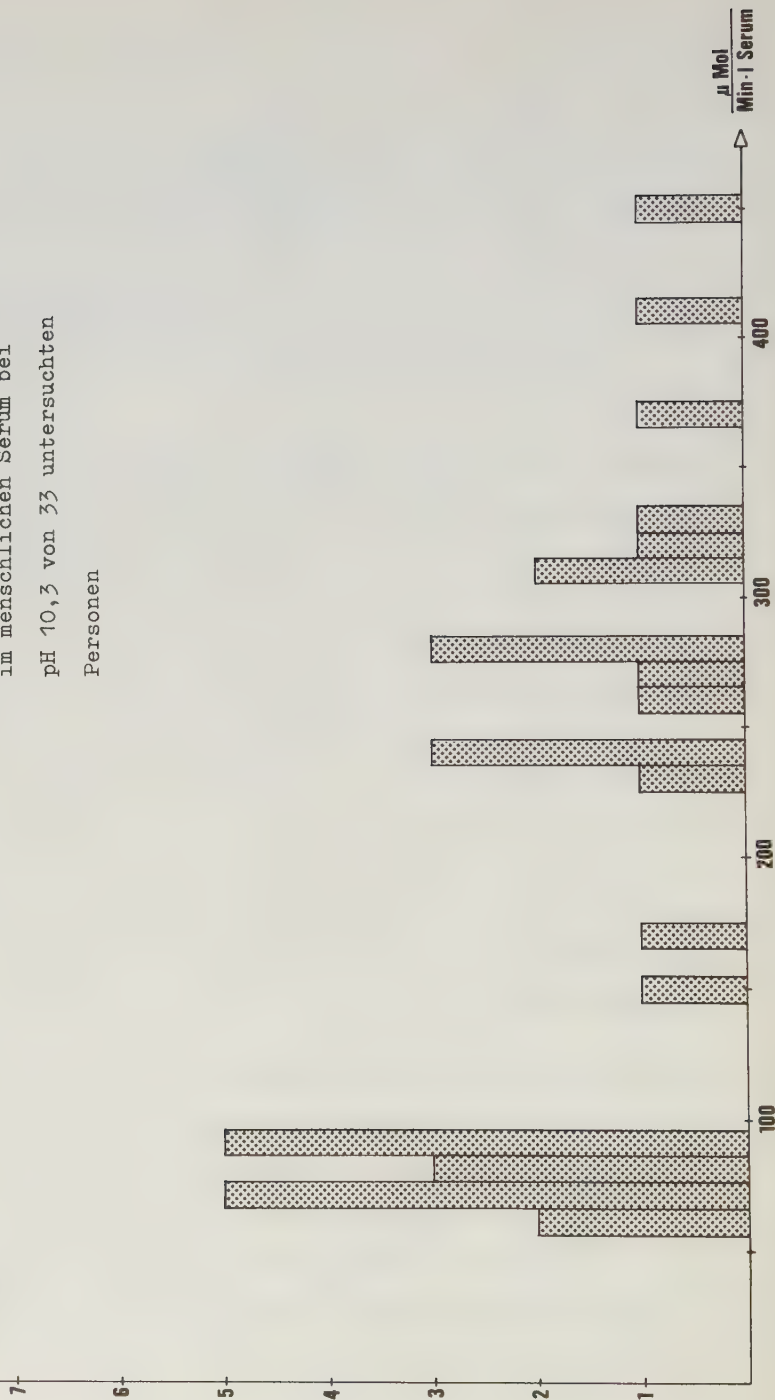
Einzelwerte sind in Tabelle 1 zusammengestellt, geordnet nach steigender Enzymaktivität gegenüber Paraoxon bei pH 11,2. Man erkennt deutlich, daß bei pH 10,3 die Aktivität, ausgedrückt in μMol p-Nitrophenol pro Minute und l Serum, bei den einzelnen Versuchspersonen um ein geringes vermindert wird.

Statistisch betrachtet, zeigte sich, wenn man paarweise die Differenzen ermittelt, keine größen- oder typenabhängige Aktivitätsabnahme. Es handelt sich um eine konstante Abweichung, was zu einem signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Meßwerten führt. Der sich hieraus ergebende Korrelationskoeffizient von 0,90 beweist, daß ein annähernd linearer Zusammenhang zwischen beiden Meßreihen besteht. Diese Tatsache ermöglicht uns, das Spaltungsverhalten gegen E 600 mit dem gegen P=O Chlorthion vergleichend bei einem gemeinsam alkalischen pH von 10,3 zu untersuchen, ohne eine Veränderung der grundlegenden Hydrolyse-Aktivitäts-Struktur in Kauf nehmen zu müssen.

Wie Abb. 1 zeigt, liegen die Enzymaktivitäten der E 600 - Hydrolyse bei pH 10,3 im Bereich zwischen 55 und 453 μMol p-Nitrophenol (Abszisse), innerhalb dessen sich deutlich zwei Häufungen und einige hohe Einzelwerte feststellen lassen. Von den Häufungen liegt die erste etwa unter 100 μMol , die andere zwischen 230 und

△ Anzahl der
Personen

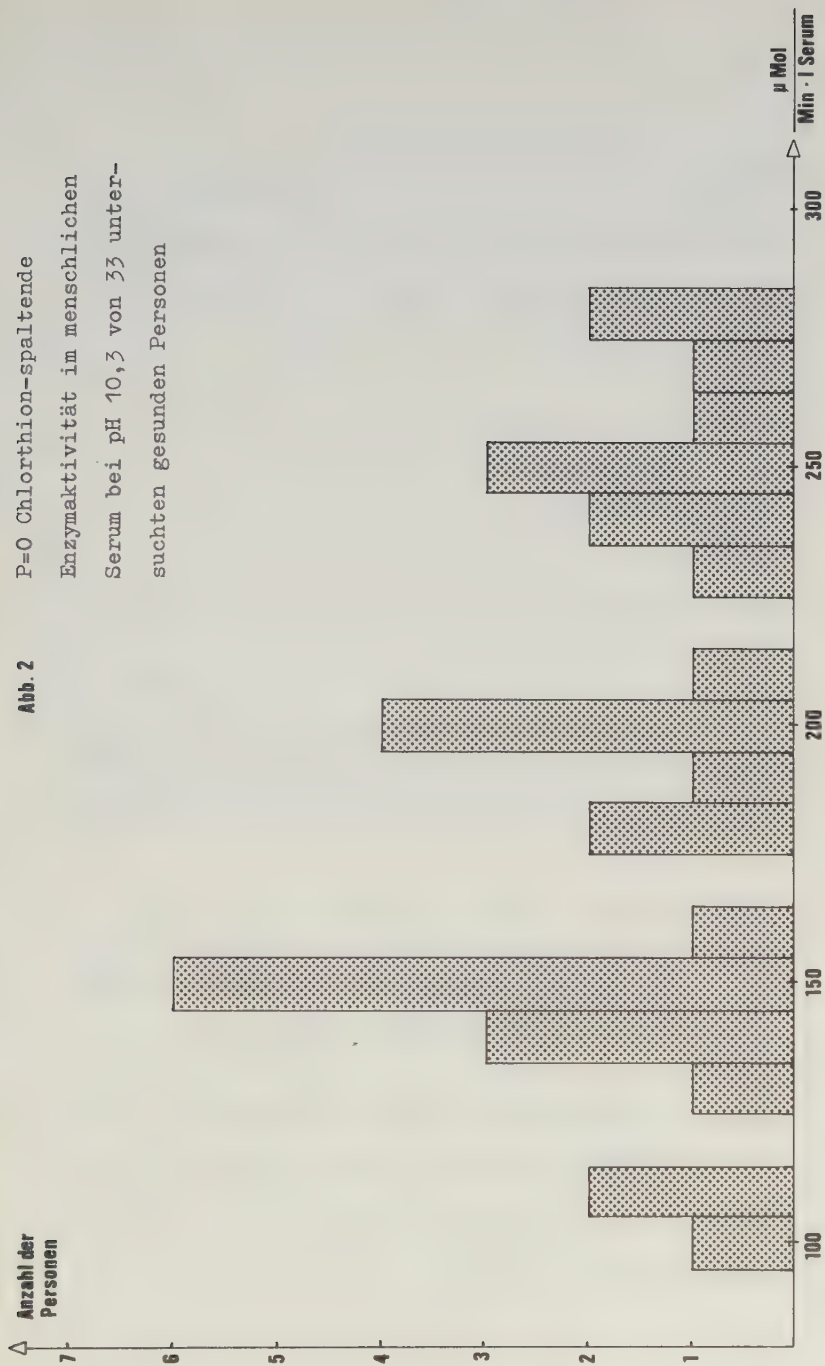
Abb. 1 E 600-spaltende Enzymaktivität
im menschlichen Serum bei
pH 10,3 von 33 untersuchten
Personen



△ Anzahl der
Personen

Abb. 2

P=O Chlorthion-spaltende
Enzymaktivität im menschlichen
Serum bei pH 10,3 von 33 unter-
suchten gesunden Personen



330 μMol , die hohen Aktivitäten letztlich oberhalb 370 μMol p-Nitrophenol. Trägt man diese Werte in ein Wahrscheinlichkeitsnetz ein (Abb. 3 b), stellt sich grob gesehen eine Doppelgipfeligkeit der Verteilung dar. Letztere graphische Verteilungsdarstellung entspricht jedoch nicht dem Bild aus Abb. 1. Dort erhielten wir gerade im Bereich von 230 und 330 μMol eine starke Aktivitätshäufung, welche in Abb. 3 b ganz unterzugehen scheint.

Ziehen wir nun zu letzterer Beobachtung die Ergebnisse der E 600-spaltenden Aktivitäten bei pH 11,2 heran (Abb. 3 a), welche ja mit denen bei 10,3 in einem direkten linearen Zusammenhang stehen, so können wir innerhalb der "hohen" Aktivitätsgruppen eine deutlich sichtbare Doppelgipfeligkeit der Verteilung feststellen.

Analog zur Abb. 1 sind in der Abb. 2 die P=O Chlor-thion-spaltenden Enzymaktivitäten derselben Probanden aufgetragen. Im Vergleich zur Abb. 1 liegen hier jedoch die Werte innerhalb eines weitaus engeren Bereiches, nämlich zwischen 95 und 280 μMol 3-Chlor-p-nitrophenol. Aus diesem Grund ist es auch weitaus schwieriger, jene sich bei den E-600-spaltenden Aktivitäten abzeichnende Dreier-Häufung als eine nicht vom Zufall her bestimmte Konstellation zu erkennen.

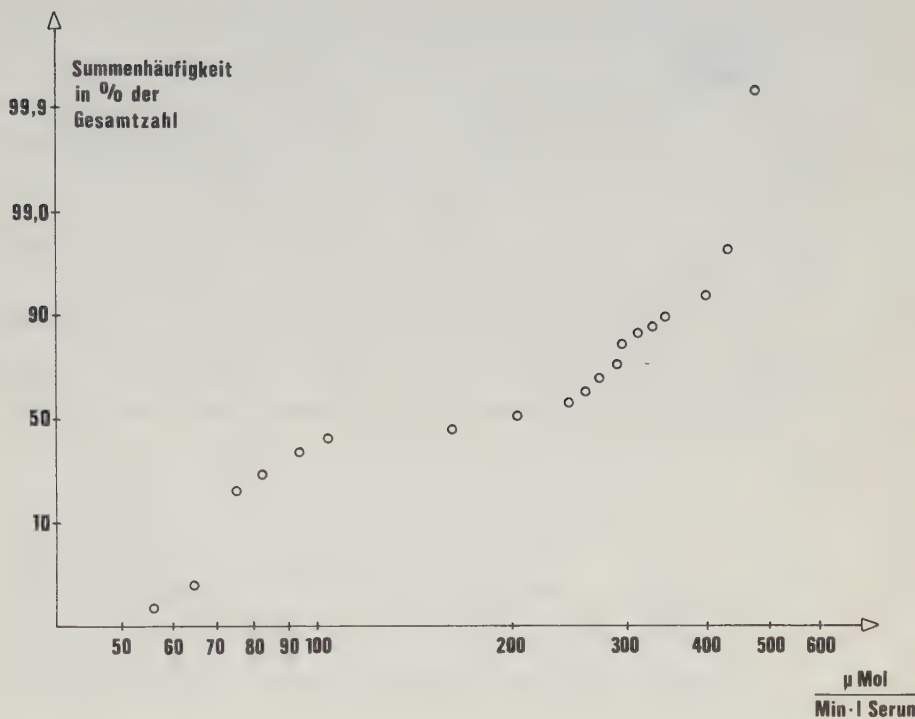


Abb. 3a

E 600-spaltende Enzymaktivität
im Serum von 33 gesunden Personen
bei pH 11,2.

(Abszisse logarithmisch, Ordina-
te nach dem Gauß'schen Integral
geteilt)

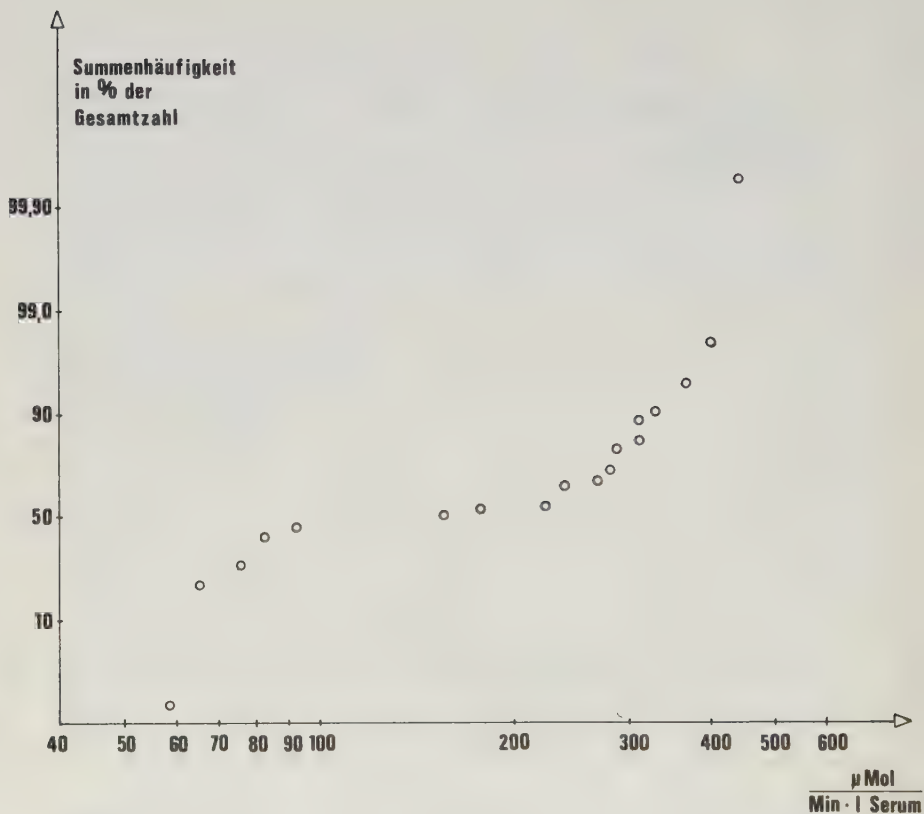


Abb. 3b

E 600-spaltende Enzym-
aktivität im Serum von
33 gesunden Personen
bei pH 10,3.

Darstellung im Wahr-
scheinlichkeitsnetz
(Abszisse logarithmisch,
Ordinate nach dem Gauß'schen
Integral geteilt)

Daß es sich meines Erachtens in diesem Falle nicht um eine mögliche Gauß'sche Verteilung, d.h. eine einzige Häufung handelt, zeigt uns die Darstellung der Einzelwerte der P=O Chlorthion - spaltenden Aktivitäten im Wahrscheinlichkeitsnetz (Abb. 4).

Auch hier läßt sich bei genauer Betrachtung (Vergleich mit Abb. 2) und in Anbetracht der Tatsache, daß in diesem Fall die Aktivitäten in einem relativ engen Wertebereich komprimiert sind, eine Drei-Gipfeligkeit erkennen.

Die Vermutung, daß sich die Verteilungsbilder der E 600 - und P=O Chlorthion - hydrolysierenden Aktivitäten einander so ähneln, wird durch den ermittelten Korrelationskoeffizienten von 0,90 entscheidend bekräftigt.

In der statistischen Auswertung ergeben sich zudem gegenüber der E 600 - spaltenden Enzymaktivität größenabhängige Abweichungen. Die "niedrige" Aktivitätsgruppe weist positive Differenzen von unregelmäßiger Größenordnung auf, die "höheren" Aktivitäten dagegen zunehmend größere negative Differenzen. Es handelt sich hier um eine Inhomogenität innerhalb der weniger differenzierten P=O Chlorthion - spaltenden Aktivitätswerte, deren Ursachen später diskutiert werden sollen.

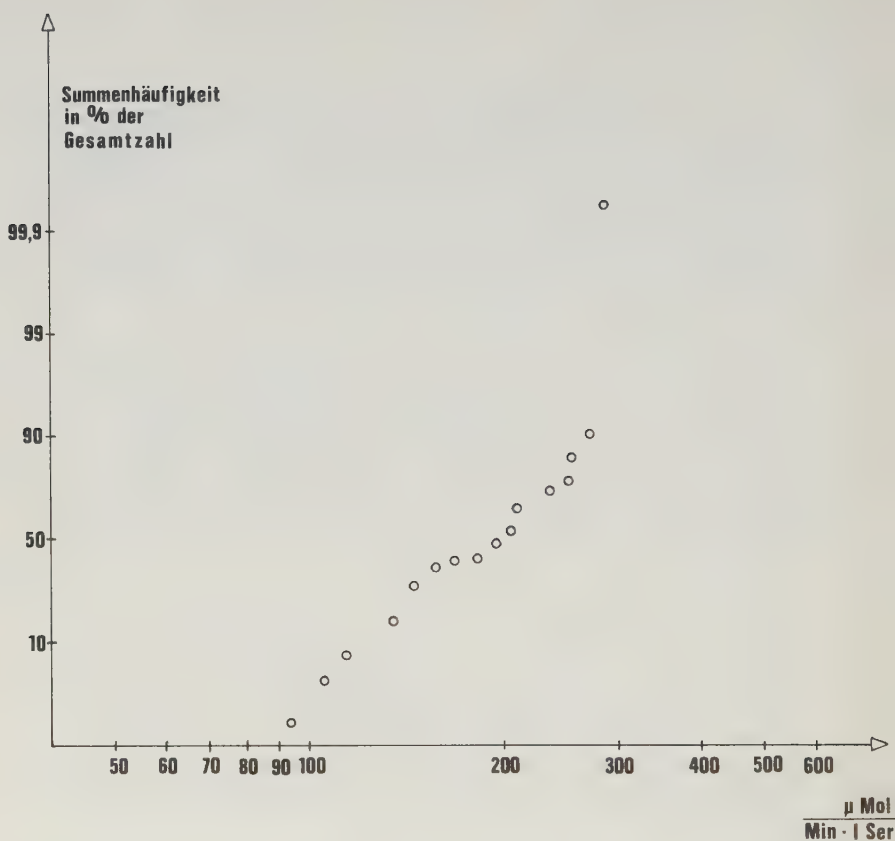


Abb. 4

P=0 Chlorthion-spaltende
Enzymaktivität im Serum
von 33 gesunden Personen.
Darstellung im Wahrschein-
lichkeitsnetz (Abszisse
logarithmisch, Ordinate
nach dem Gauss'schen In-
tegral geteilt)

Diskussion und Zusammenfassung

Die Ergebnisse meiner Untersuchung über die Hydrolyse von E 600, Chlorthion und P=O Chlorthion im menschlichen Serum lassen erneut erkennen, daß im Serum Enzyme vorhanden sind, die Alkyl-Aryl-Triphosphorsäureester an der Anhydridbindung zu spalten vermögen, solange an der Phosphorsäuregruppe der Sauerstoff nicht durch Schwefel ersetzt ist (siehe auch AUGUSTINSSON 1954 d; BURGIS). Es war also keine Enzymaktivität gegenüber Chlorthion nachzuweisen. Es soll damit jedoch nicht gesagt sein, daß es überhaupt kein Serumenzym gibt, welches Thiophosphorsäureester dieser Art hydrolysiert, denn es ist durchaus möglich, daß durch das stark alkalische Milieu Thiophosphorsäureester-spezifische Enzyme gehemmt oder zerstört wurden.

Bei E 600 und P=O Chlorthion als Substrat ergaben sich jeweils drei Aktivitätsgruppen, welche zwar im einzelnen eine gewisse Streuung aufweisen, jedoch aus Abb. 1 mit 4 als solche klar zu erkennen sind. Dieses Ergebnis dürfte ein weiterer Beweis für die Theorie eines Polymorphismus des E 600 - spaltenden Ferments sein, wie er von BAUMGARTNER (1970) diskutiert wurde. Die mehr oder weniger großen Streuungen innerhalb der einzelnen Aktivitätsgruppen sind wahrscheinlich auf verschie-

dene Faktoren zurückzuführen, etwa dem Vorkommen von Ionen, von denen die einen als Aktivatoren, andere wiederum als Inhibitoren fungieren können; auch könnten unterschiedliche Proteinadsorptionen des Serums bestehen, wie es von SCHAUMANN und SCHILLER (1960) am Serum weißer Mäuse beobachtet wurde. Ferner sind zeitlich abhängige Aktivitätsschwankungen von Einzelpersonen zu berücksichtigen. Nicht zuletzt bildet das Untersuchungsverfahren viele Möglichkeiten für Meßungenauigkeiten.

Stellen wir nun die Ergebnisse der E 600 - Hydrolyse denen der P=O Chlorthion - Hydrolyse gegenüber, so läßt sich die enge Beziehung im hydrolytischen Verhalten einerseits durch die Dreiergruppierung der Enzymaktivitäten, andererseits durch den Korrelationskoeffizienten von 0,90 nachweisen. Dies stärkt jene Vermutung, daß dieselbe Enzymgruppe für die Spaltung beider Substrate zuständig ist.

Für das Zustandekommen jener niedrigen, mittleren und hohen Enzymaktivitäten sind folgende Möglichkeiten betreffs der Enzymstruktur im menschlichen Serum in Erwägung zu ziehen:

1. Bei einem einzigen Enzym (KRISCH 1969), das für die Hydrolyse von E 600 bzw. P=O Chlorthion verantwortlich ist, wären die Aktivitätsunterschiede rein quantitativ zu erklären.

2. Heute ist man sich doch weitgehend einig, daß nicht ein einziges Enzym für jene Phosphorsäureester-Spaltung verantwortlich ist.

Ähnlich der Modellvorstellung über die Enzymstruktur der Serumcholinesterase von LA MOTTA und WORONICK (1971), ließe sich demnach die Verteilung der von mir betrachteten Phosphorsäureester (P=O Chlorthion und E 600) - spaltenden Serumenzyme in dem Sinne erklären, daß es eine spezifische Enzymgruppe gibt, die sich aus einzelnen Isoenzymen zusammensetzt. Ihre Unterschiede lägen dann in molekularer Größenordnung, was heißt, daß jene Isoenzyme sich untereinander vermutlich durch eine unterschiedliche Anzahl von ähnlichen Untereinheiten auszeichnen, was sich in einer mehr oder weniger starken Aktivität bezüglich der Hydrolyse von Phosphorsäureestern äußert.

Genetisch betrachtet könnten ihre Gene vielleicht als allelomorphische Varianten angesehen werden.

Als weitere Möglichkeit wären nicht-allele Gene zu erwägen. Die dazugehörigen Enzyme sind dann nicht als

Isoenzyme zu betrachten, sondern als eine isolierte Enzymgruppe, lediglich mit einem ähnlichen hydrolytischen Verhalten.

Endgültiges läßt sich in dieser Fragestellung vermutlich erst dann sagen, wenn man die verantwortlichen Enzyme wenigstens annähernd isoliert hat.

Wir fanden zudem bei der P=O Chlorthion-Hydrolyse eine Inhomogenität der Enzymaktivitäten zu den Versuchsergebnissen mit E 600 : Die niedrigen Aktivitäten liegen bei P=O Chlorthion im ganzen höher als bei E 600, die mittleren und hohen Typen dagegen nehmen an Aktivität ab. Es ist sehr wahrscheinlich, daß das am Phenolring substituierte Chlor diese Inhomogenität hervorruft. Das in 3-Stellung stehende Chloratom wirkt bei dem einen Enzym aktivierend, bei dem anderen hemmend, d.h. es erhöht bzw. senkt die Affinität des jeweiligen Enzyms zum Substrat. Daß nicht die veränderte Alkyl-Gruppe (bei E 600 = Äthyl-; bei P=O Chlorthion = Methyl-) ausschlaggebend ist, konnte erst vor kurzem von BURGIS bewiesen werden.

Unsere Ergebnisse würden somit nicht der Auffassung von einem 2-Enzym-System, wie sie in der Literatur wiederholt geäußert wurde, widersprechen. Vielleicht

sind es jene zwei Enzyme, von denen 1961 ERDÖS und BOGGS und später (1968) SKRINJARIC-SPOLJAR und Mitarb. das eine in der Fraktion IV-1 und das andere in der Albuminfraktion (V) nachweisen und damit gleichzeitig gereinigt darstellen konnten.

Literaturverzeichnis

ALDRIDGE, W.N.

Serum Esterases 1. Two types of esterase (A and B)
hydrolysing p-nitrophenyl acetat, propionate and butyrate, and a method of their determination
Biochem. J. 53, 110 (1953 a)

ALDRIDGE, W.N.

Serum Esterases 2. An enzyme hydrolysing diethyl p-nitrophenyl phosphate (E 600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera
Biochem. J. 53, 117 (1953 b)

AUGUSTINSSON, K.-B. and G. Heimbürger

The enzymic hydrolysis of organophosphorus compounds
Biochem. Biophys. Acta 13, 303 (1954 a)

AUGUSTINSSON, K.-B. and G. Heimbürger

Enzymic hydrolysis of organophosphorus compounds
I. Occurrence of enzymes hydrolysing dimethylamidooxyphosphoryl cyanide (Tabun)
Acta Chem. Scand. 8, 753 (1954 b)

AUGUSTINSSON, K.-B. and G. HEIMBÜRGER

Enzymic hydrolysis of organophosphorus compounds

II. Analysis of reaction products in experiments with

Tabun and some properties of blood plasma tabunase

Acta Chem. Scand. 8, 762 (1954 c)

AUGUSTINSSON, K.-B. and G. HEIMBÜRGER

Enzymic hydrolysis of organophosphorus compounds

III. Effect of cholinesterase inhibition and inhibi-

tion of cholinesterase in the presence of tabunase

Acta Chem. Scand. 8, 915 (1954 d)

AUGUSTINSSON, K.-B. and G. HEIMBÜRGER

Enzymic hydrolysis of organophosphorus compounds

IV. Specificity studies

Acta Chem. Scand. 8, 1533 (1954 e)

AUGUSTINSSON, K.-B. and G. HEIMBÜRGER

Enzymic hydrolysis of organophosphorus compounds

V. Effect of phosphorylphosphatase on the inactivation

of cholinesterase by organophosphorus compounds in

vitro

Acta Chem. Scand. 9, 310 (1955 a)

AUGUSTINSSON, K.-B. and G. HEIMBÜRGER

Enzymic hydrolysis of organophosphorus compounds
VII. The stereospecificity of phosphorylphosphatases
Acta Chem. Scand. 11, 1371 (1957)

BAUMGARTNER, W.

Untersuchungen über einen Zusammenhang zwischen fermentativem E 600 - Abbau und Vergiftung der Cholinesterase durch E 600 im menschlichen Serum
Dissertation Erlangen (1970)

BURGIS, H.

Dissertation Erlangen, in Vorbereitung

ERDÖS, E.G. and L.E. BOGGS

Hydrolysis of paraoxon in mammalian blood
Nature 190, 716 (1961)

GELDMACHER-V. MALLINCKRODT, M. und H.H. LINDORF

Unterschiedliche Reaktion menschlicher Serumcholinesterasen mit Alkylphosphaten
Vortrag auf der 48. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin in Berlin 6. - 9.10.1969

GELDMACHER - v. MALLINCKRODT, M., U. RABAST und
H. H. LINDORF

Unterschiedliche Reaktion menschlicher Serum-Cholin-
esterasen mit E 600 (O,O-Diäthyl-O-(p-nitrophenyl)-
phosphat)

Arch. Toxikol. 25, 223 (1969)

GROB, D., J.L.Jr. LILIENTHAL, A.M. HARVEY and
B.F. JONES

The administration of di-isopropyl fluorophosphate
(DFP) to man.

I. Effect on plasma and erythrocyte cholinesterase;
general systemic effects; use in study of hepatic
function and erythro-poiesis; and some properties of
plasma cholinesterase

Bulletin John Hopkins Hospital 81, 217 (1947)

KRISCH, K.

Enzymatische Hydrolyse von Diäthyl-p-nitrophenylphosphat
(E 600) durch menschliches Serum

Z. klin. Chem. klin. Biochem. 6, 41 (1968)

LA MOTTA, R.V. and Ch. L. WORONICK

Molecular heterogeneity of human serum cholinesterase

Clin. Chem. 17, 135 (1971)

MAIN, A.R.

The purification of the enzyme hydrolysing diethyl-
p-nitrophenyl phosphate (paraoxon) in sheep serum
Biochem. J. 74, 10 (1960)

MAZUR, A. and O. BODANSKY

The mechanism of in vitro and in vivo inhibition of
cholinesterase activity by diisopropyl fluorophosphate
J. Biol. Chem. 163, 261 (1946 a)

MAZUR, A. and O. BODANSKY

An enzyme in animal tissues capable of hydrolysing
the phosphorus-fluorine bond of alkyl fluorophosphates
J. Biol. Chem. 164, 271 (1946b)

MOUNTER, L.A.

Metabolism of organophosphorus anticholinesterase agents
in: Cholinesterases and anticholinesterase agents
Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Ergänzungs-
werk XV. Herausgeb. G.B. Koelle
Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1963)

NEAL, R.A.

Studies on the metabolism of diethyl 4-nitrophenyl
phosphorothionate (parathion) in vitro
Biochem. J. 103, 183 (1967)

SCHAUMANN, W. and M. SCHILLER

Inaktivierung von Alkylphosphaten im Gehirn und im
Serum
Arch. exptl. Pathol. Pharmacol. 239, 114 (1960)

SCHRADER, G.

Chlorthion: Ein neues wenig giftiges Insektizid aus der
Reihe der Thiophosphorsäureester
Angewandte Chem. 66, 265 (1954)

SKRINJARIC-SPOLJAR, M. and E. REINER

Hydrolysis of diethyl-p-nitrophenylphosphate and
ethyl-p-nitrophenylethylphosphate by human sera
Biochim. Biophys. Acta 165, 289 (1968)

WAGNER-JAUREGG, Th.

Modellreaktionen phosphorhaltiger Enzym-Inaktivatoren
Arzneimittel-Forsch. (Aulendorf) 4, 527 (1954)

Herrn Prof. Dr. Dr. E. Weinig danke ich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes an seinem Institut, für sein stetes Interesse und für die Übernahme des Korreferats.

Frau Prof. Dr. Dr. M. Geldmacher-v. Mallinckrodt darf ich für die freundliche Überlassung des Themas und die Übernahme des Referats herzlich danken, besonders aber dafür, daß sie mir zu jeder Zeit mit guten Ratschlägen behilflich war.

Mein Dank gilt auch Frau Dr. M. Pétenyi, die mir bei der statistischen Auswertung meiner Ergebnisse große Hilfe zukommen ließ.

Lebenslauf

Am 26. September 1948 wurde ich als Sohn des Bank- und Versicherungskaufmanns Hans Metzner und seiner Ehefrau Annette, geb. Günder, in Bamberg geboren.

Von 1954 bis 1958 besuchte ich die Volksschule St. Martin in Bamberg, von 1958 bis 1967 das Alte Gymnasium, heute Kaiser-Heinrich-Gymnasium, in Bamberg.

Am 27. Juli 1967 legte ich die Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 1967/68 begann ich an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg mit dem Medizinstudium. An der selben Universität legte ich am 5. August 1968 die naturwissenschaftliche und am 27. Februar 1970 die ärztliche Vorprüfung ab.

Im Sommersemester 1973 schloß ich mein Medizinstudium mit Ablegung der ärztlichen Prüfung (30. Juli 1973) ab.

Die mündliche Prüfung fand am 31. Juli 1973 statt.

